



تأثیر زادیتن و N-استیل‌سیستئین بر روی پارامترهای اسپرمی و محتوای پروتامین در مردان نابارور پس از واریکوسلکتومی

رقیه آقایی بروجنی^{۱*}، لیلا آزادی^۱، مهنوش بهادرانی^۲، مرضیه تولائی^۱، محمدحسین نصر اصفهانی^{۳*}

۱- گروه زیست‌فناوری تولیدمثل، مرکز تحقیقات پزشکی تولیدمثل، پژوهشکده زیست‌فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

۳- مرکز باروری و ناباروری اصفهان، اصفهان، ایران

*مسئول مکاتبات: mh.nasr-esfahani@royaninstitute.org

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۷

چکیده

واریکوسل بعنوان یکی از شایع‌ترین علل ناباروری که اتساع ورید اسپرماتیک در شبکه پامپینی‌فرم رخ می‌دهد، شناخته شده است. کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی و افزایش ماست‌سل‌ها به عنوان سلول‌هایی که در التهاب و استرس اکسیداتیو نقش دارند، می‌توانند از جمله عوامل اصلی دخیل در نقص فرآیند اسپرماتوژنز در این افراد باشند. واریکوسلکتومی بعنوان عمل جراحی اصلاح‌کننده واریکوسل، می‌تواند همراه با مصرف دارو و یا بدون مصرف دارو باشد. برخی مطالعات پیشنهاد می‌کنند که مصرف دارو بعد از عمل جراحی برای بهبود بیشتر پارامترهای اسپرمی مفید است. هدف مطالعه حاضر، مقایسه تأثیر N-استیل‌سیستئین (NAC) بعنوان یک آنتی‌اکسیدان و زادیتن به عنوان یک ماست‌سل‌بلاک‌کننده بر روی پارامترهای اسپرمی و محتوای پروتامین، قبل و سه ماه بعد از عمل در افراد واریکوسل، می‌باشد. در این مطالعه گذشته‌نگر، افراد کاندید عمل جراحی واریکوسلکتومی به سه گروه، کنترل (n = ۴۸)، درمان با داروی زادیتن (۱ میلی‌گرم در روز، n = ۴۷) و درمان با داروی NAC (۲۰۰ میلی‌گرم در روز، n = ۳۵)، به مدت ۳ ماه، تقسیم شدند. قبل و بعد از مصرف دارو و یا عمل جراحی، پارامترهای اسپرمی و محتوای پروتامین به ترتیب، براساس دستورالعمل سازمان بهداشت جهانی (۲۰۱۰) و رنگ‌آمیزی کرومومایسین A₃ بررسی گردید. پارامترهای اسپرمی شامل غلظت، تحرک، مورفولوژی و محتوای پروتامین بعد از عمل و مصرف دارو در هر دو گروه درمان با NAC و زادیتن به طور معنی‌داری افزایش یافت (p < ۰/۰۵). در گروه زادیتن در مقایسه با گروه NAC، میانگین پارامترهای اسپرمی به طور غیرمعنی‌داری بالاتر و درصد کمبود پروتامین به طور غیرمعنی‌داری پایین‌تر است. فقط درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در گروه زادیتن نسبت به گروه NAC، بطور معنی‌داری پایین‌تر است. در نتیجه، هر دوی این داروها برای بهبود پارامترهای اسپرمی و محتوای پروتامین مفید هستند.

کلمات کلیدی: زادیتن، N-استیل‌سیستئین، واریکوسل، پارامترهای اسپرمی.

مقدمه

بیضه است که با اتساع و پیچش عروق شبکه‌ی پامپینی‌فرم یا شبکه وریدی کرماتریک آشکار می‌شود و به طور عمده با افزایش دمای بیضه، اختلال

واریکوسل به عنوان یکی از دلایل شایع ناباروری مردان و تقریباً علت ناباروری ۴۰ درصد از مردان نابارور می‌باشد. واریکوسل، اختلال در وریدهای

هورمونی با تأثیر بر محور هیپوتالاموس-هیپوفیز-گناد، هیپوکسی (کاهش جریان خون سرخرگی و اختلال متابولیسم انرژی و تخریب سلول‌های زایا)، تجمع کادمیوم و اختلال فراساختاری در سلول‌های سرتولی همراه است (۷).

مطالعات مختلف کاهش پارامترهای اسپرمی و افزایش سطح آسیب DNA اسپرم را به دنبال واریکوسل نشان داده‌اند که می‌تواند دلیل کاهش باروری در این افراد باشد. افزایش آسیب DNA اسپرم، احتمالاً ناشی از افزایش آپوپتوز، نقص در بسته‌بندی کروماتین، افزایش ROS (گونه اکسیژن واکنشگر) و استرس دمایی می‌باشد (۱۸، ۲۴). افزایش دمای اسکروتوم از طریق بازگشت خون شکمی بعث عملکرد نامناسب دریچه وریدهای اسپرماتیک است که منجر به آسیب‌های زیادی می‌شود. از جمله این آسیب‌ها، کاهش سنتز تستوسترون بوسیله سلول‌های لیدیک و کاهش عملکرد ترشحی سلول‌های سرتولی می‌باشد. همچنین، با توجه به اینکه ارتباط مستقیمی بین افزایش دمای اسکروتوم و استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) در بیضه وجود دارد؛ احتمالاً، استرس دمایی می‌تواند یکی از دلایل اصلی تولید استرس اکسیداتیو در افراد مبتلا به واریکوسل باشد. استرس دمایی باعث افزایش تولید ROS از میتوکندری، غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم و پراکسی-زوم می‌شود (۸).

پراکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده غشا و کاهش سیالیت غشا ناشی از آن، اثر مضر بر روی ساختار سر و غشاء ناحیه میانی اسپرم دارد و در نهایت منجر به کاهش تحرک اسپرم می‌شود. همچنین، مارکرهای استرس اکسیداتیو مانند پروتئین‌های تغییرشکل‌یافته‌ی ۴-هیدروکسی نونئال، ۸-هیدروکسی ۲-داکسی گوانوزین (8-OHdG) و مالون دی آلدئید (MDA) اسپرم به طور معنی‌داری در افراد نابارور

مبتلا به واریکوسل افزایش یافته و باعث افزایش روند آپوپتوز و آسیب اکسیداتیو DNA اسپرم شده و با تأثیر بر پتانسیل باروری اسپرم، می‌تواند کلیواژ، تکامل بلاستوسیست و ظرفیت لانه‌گزینی را تحت تأثیر قرار دهد (۱، ۸).

یکی از روش‌های درمان واریکوسل، استفاده از عمل جراحی می‌باشد که نتایج مطالعات نشان می‌دهد که درمان واریکوسلکتومی، استاندارد طلایی برای درمان این افراد است (۱۶). از سوی دیگر مصرف دارو بعد از عمل واریکوسل، احتمالاً می‌تواند باعث بهبودی بیشتر پارامترهای اسپرمی و سلامت کروماتین اسپرم شود و شانس دستیابی به حاملگی طبیعی را افزایش دهد و یا شاید گاهی استفاده از عمل جراحی به تنهایی کارساز باشد (۲۳، ۳۱، ۳۲). تاکنون داروهای مختلفی برای درمان افراد نابارور مبتلا به واریکوسل پیشنهاد شده است. از جمله داروهای استفاده شده در ناباروری مردان داروهای ماست سل بلاکر مانند زادیتن (Zaditen) یا کتوتیفن (Ketotifen) و آنتی‌آکسیدان-ها، مانند N-استیل سیستئین (NAC) می‌باشد. استفاده از زادیتن به دلیل افزایش تعداد ماست سل‌ها در بیضه مردان نابارور و ایجاد فیروز در اطراف لوله‌های منی-ساز است که اختلالات اسپرماتوژنز را به همراه دارد. مطالعات مختلف بهبود پارامترهای اسپرمی و میزان حاملگی را به دنبال استفاده از داروهای ماست سل بلاکر نشان داده‌اند (۴، ۲۱، ۲۹). N-استیل سیستئین یک گونه استیله آمینواسید L-سیستئین است. این آنتی‌آکسیدان به آسانی از غشاء سلول عبور کرده و پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد است. همچنین، N-استیل-سیستئین پیش‌برنده سنتز گلوکوتایون داخل سلولی می‌باشد (۲۰).

گلوکوتایون یکی از آنتی‌آکسیدان‌های مهم بدن است و با بی‌اثر کردن اثر مواد سمی مختلف، ترکیبات پراکسید و سایر مولکول‌های مولد رادیکال‌های آزاد،



عقوننت ادراری، سندرم کلاین‌فلتر و ناباروری با فاکتور زنانه از مطالعه حذف شدند. نمونه مایع منی افراد بعد از ۳-۴ روز پرهیز از مقاربت جمع‌آوری گردید و از لحاظ پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک، مورفولوژی) بر اساس معیار سازمان بهداشت جهانی (WHO, ۲۰۱۰) (۳۵) به شرح زیر مورد ارزیابی قرار گرفت. غلظت نمونه اسپرمی با استفاده از دستگاه شمارش اسپرم (Makler Counting Chamber) بر حسب میلیون بر لیتر و میزان تحرک اسپرم به وسیله نرم‌افزار CASA (Computer Aided Sperm Analysis) و میکروسکوپ نوری بررسی گردید. بر اساس این نرم‌افزار، چهار نوع حرکت گزارش می‌شود که شامل حرکت پیشرونده سریع و خطی (A) و آهسته و خطی (B)، حرکت غیرپیشرونده (C) و بدون حرکت (D) می‌باشد. مجموع حرکت A, B و C به عنوان درصد کل تحرک گزارش می‌گردد. مورفولوژی اسپرم با استفاده از رنگ‌آمیزی Diff quick، ارزیابی گردید. ابتدا از نمونه اسپرمی بر روی لام، اسمیر تهیه شد، لام‌ها به مدت ۷۵ ثانیه در محلول ثبیت کننده و سپس به مدت ۶۰ ثانیه در محلول رنگ آمیزی ۱ (گزانتین ائوزینوفیلیک) و به مدت ۱۰ ثانیه در محلول رنگ‌آمیزی ۲ (تازین بازوفیلیک) قرار گرفت. پس از رنگ آمیزی اسپرم‌هایی طبیعی در نظر گرفته می‌شود که دارای یک سر بیضی‌شکل با محیط صاف باشد که ساختار آکروزوم ۴۰ تا ۷۰ درصد از آن را پوشانیده است و قاعده سر بصورت متقارن به دم متصل شده است. کمبود پروتامین از طریق رنگ‌آمیزی کرومومایسین A_3 (Chromomycin A3-: CMA₃) A₃ (Staining)، به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفت (۲۲). ابتدا نمونه مایع منی شسته شده با PBS را در محلول کارنوی (متانول و اسید استیک گلاسیال به نسبت ۳:۱) به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد فیکس و از آن بر روی لام، اسمیر تهیه گردید. هر لام

می‌تواند نقش مؤثری در حفاظت سلولی ایفا کند و در افراد نابارور با افزایش ظرفیت کل آنتی‌اکسیدان‌های سرمی و کاهش سطح استرس اکسیداتیو باعث بهبود پارامترهای اسپرمی گردد (۹، ۱۳).
اخیراً داروی NAC به عنوان یک درمان تکمیلی بعد از عمل واریکوسلکتومی، منجر به سلامت کروماتین و میزان باروری در افراد مبتلا به واریکوسل شده است (۶). با توجه به افزایش سطح استرس اکسیداتیو در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل و عدم تعادل بین سطوح آنتی‌اکسیدان‌ها و ROS (۵) و همچنین افزایش ماست‌سل‌ها در بیضه‌ی این افراد، هدف از مطالعه‌ی حاضر، بررسی تاثیر NAC به عنوان آنتی-اکسیدان، و زادیتن به عنوان ماست‌سل بلاکر بر روی پارامترهای اسپرمی و محتوای پروتامین بعد از عمل واریکوسلکتومی نسبت به قبل از عمل می‌باشد.

مواد و روش کار

این مطالعه در کمیته اخلاق برای تحقیقات انسانی، در پژوهشکده رویان و مرکز باروری و ناباروری اصفهان با شماره ۹۵۰۰۰۰۴۹ به تصویب رسیده است. در این مطالعه گذشته‌نگر، افراد نابارور واریکوسل کاندید عمل جراحی واریکوسلکتومی به سه گروه: بدون دارو ($n = 48$)، درمان با داروی زادیتن ($n = 47$) با دوز یک میلی‌گرم در روز و درمان با داروی NAC ($n = 35$) با دوز روزانه ۲۰۰ میلی‌گرم (به مدت ۳ ماه) تقسیم شدند. قبل و بعد از مصرف دارو یا واریکوسلکتومی، پارامترهای اسپرمی و محتوای پروتامین اسپرم مورد بررسی قرار گرفت. معیارهای ورود این افراد به مطالعه شامل، اندازه بیضه طبیعی و واریکوسل بالینی درجه II (در این حالت اتساع وریدها بیضه قابل لمس است) و درجه III (در این حالت اتساع وریدهای بیضه قابل رؤیت است) بود. افراد آزواسپرمی، لوکوسیتواسپرمی، دارای سابقه



توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول کرومایسین A₃ (CMA₃, Sigma, USA)، (۰/۲۵ میلی گرم در میلی-لیتر بافر مک‌الوین که حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم با pH=۷) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و سپس با محلول بافر فسفات سالین (PBS) شسته و توسط میکروسکوپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی گردید. برای هر نمونه در حدود ۴۰۰ اسپرم شمارش شد. سر اسپرم‌هایی که دارای کمبود پروتامین بوده، زرد درخشان که به صورت درصد اسپرم‌های CMA₃⁺ گزارش شده و آنهایی که دارای پروتامین طبیعی بوده، رنگ زرد کم‌رنگ بوده و به صورت درصد اسپرم‌های CMA₃⁻ گزارش شدند (۲۲). (شکل ۱).

توسط ۱۰۰ میکرولیتر محلول کرومایسین A₃ (CMA₃, Sigma, USA)، (۰/۲۵ میلی گرم در میلی-لیتر بافر مک‌الوین که حاوی ۱۰ میلی مولار کلرید منیزیم با pH=۷) به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و سپس با محلول بافر فسفات سالین (PBS) شسته و توسط میکروسکوپ فلئورسنت با بزرگنمایی ۱۰۰ بررسی گردید. برای هر نمونه در حدود ۴۰۰ اسپرم شمارش شد. سر اسپرم‌هایی که دارای کمبود پروتامین بوده، زرد درخشان که به صورت درصد اسپرم‌های CMA₃⁺ گزارش شده و آنهایی که دارای پروتامین طبیعی بوده، رنگ زرد کم‌رنگ بوده و به صورت درصد اسپرم‌های CMA₃⁻ گزارش شدند (۲۲). (شکل ۱).

بررسی نتایج مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم بعد از عمل واریکوسلکتومی نسبت به قبل از عمل نشان می‌دهد که درصد مورفولوژی غیر طبیعی اسپرم بعد از عمل واریکوسلکتومی نسبت به قبل از عمل در گروه کنترل (۱/۰۸ ± ۸۱/۵۷ در مقابل ۰/۸۸ ± ۸۴/۷۵، $p = ۰/۱$)، زادیتن (۱/۱۱ ± ۷۴/۳۴ در مقابل ۰/۸۲ ± ۸۶/۱۰، $p = ۰/۰۰$) و NAC (۰/۶۵ ± ۸۸/۴۸ در مقابل ۰/۷۱ ± ۹۲/۶۵، $p = ۰/۰۴$) می‌باشد، که نشان می‌دهد در گروه زادیتن و NAC درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی، بعد از عمل به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (نمودار ۳).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آنالیز آماری به وسیله نرم افزار SPSS ۱۸ (SPSS, Chicago, IL, USA) با استفاده از آنالیز توصیفی، One-Way ANOVA و Paired sample T-test مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، P-Value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نتایج

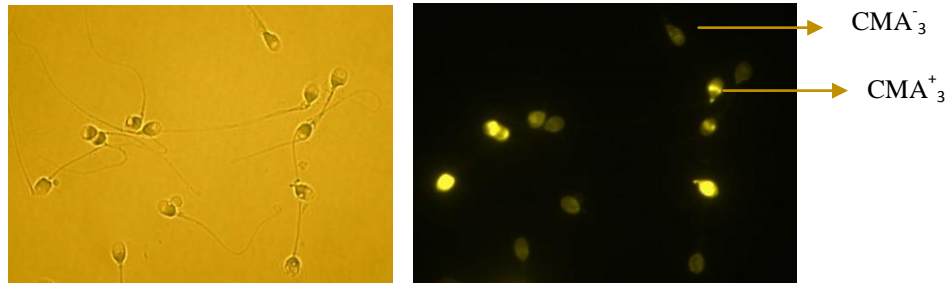
نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که سن مردان، پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی غیرطبیعی) و درصد کمبود پروتامین اسپرم قبل از عمل جراحی، در هر سه گروه کنترل، زادیتن و NAC از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشته است ($p > ۰/۰۵$). (جدول ۱).

بررسی کمبود پروتامین اسپرم بعد از عمل واریکوسلکتومی نسبت به قبل از عمل نشان می‌دهد که درصد کمبود پروتامین اسپرم بعد از عمل واریکوسلکتومی نسبت به قبل از عمل در گروه کنترل (۱/۸۵ ± ۴۲/۴۲ در مقابل ۱/۰۷ ± ۵۰/۲۲، $p = ۰/۰۱$)، زادیتن (۲/۳۳ ± ۳۸/۴۴ در مقابل ۱/۵۰ ± ۵۳/۸۹، $p = ۰/۰۱$) و NAC (۲/۰۸ ± ۴۲/۲۸ در مقابل ۲/۴۱ ± ۵۱/۲۸، $p = ۰/۰۱$) می‌باشد، که نشان می‌دهد در سه گروه، درصد کمبود پروتامین اسپرم

بر خلاف گروه کنترل که فقط عمل واریکوسلکتومی داشته‌اند و هیچ اختلاف معنی‌داری در غلظت اسپرم قبل (۲/۸۳ ± ۱۹/۹۳) و بعد از عمل واریکوسلکتومی (۳/۲۷ ± ۲۹/۷۸) وجود ندارد، در گروه زادیتن (۳/۷۵ ± ۵۷/۳۵ در مقابل ۲/۶۳ ± ۳۱/۸۷، $p = ۰/۰۰$) و NAC (۵/۹۶ ± ۴۹/۱۴ در مقابل ۴/۴۱ ± ۲۹/۰۵،

بعد از عمل واریکوسلکتومی در سه گروه کنترل، زادیتن و NAC به ترتیب $1/08 \pm 81/57$ و $1/11 \pm 74/34$ و $0/65 \pm 88/48$ می‌باشد (نمودار ۵). در گروه زادیتن در مقایسه با گروه NAC، میانگین پارامترهای اسپرمی به طور غیرمعنی‌داری بالاتر و درصد کمبود پروتامین به طور غیرمعنی‌داری پایین‌تر است. فقط درصد اسپرم‌های دارای مورفولوژی غیرطبیعی در گروه زادیتن نسبت به گروه NAC، بطور معنی‌داری پایین‌تر است.

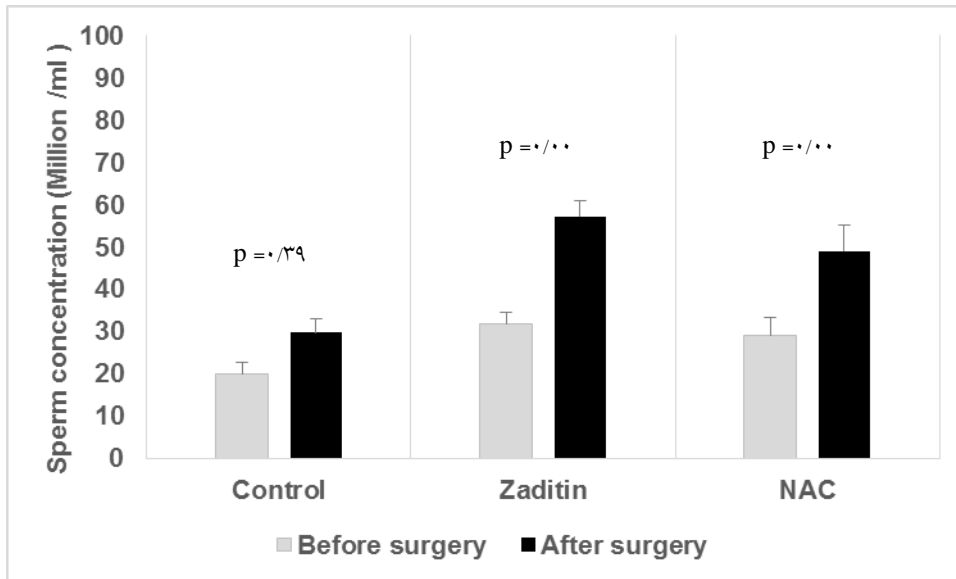
بعد از عمل نسبت به قبل از عمل، به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد (نمودار ۴). بررسی پارامترهای اسپرمی و درصد کمبود پروتامین اسپرم بعد از عمل واریکوسلکتومی نشان می‌دهد که غلظت اسپرم در سه گروه کنترل، زادیتن و NAC به ترتیب، $3/27 \pm 29/78$ ، $3/75 \pm 57/35$ و $5/96 \pm 49/14$ می‌باشد. درصد تحرک اسپرم در این سه گروه بعد از عمل به ترتیب $2/55 \pm 2/39,70/30$ و $56/78 \pm 3/83 \pm 49/94$ است. مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم



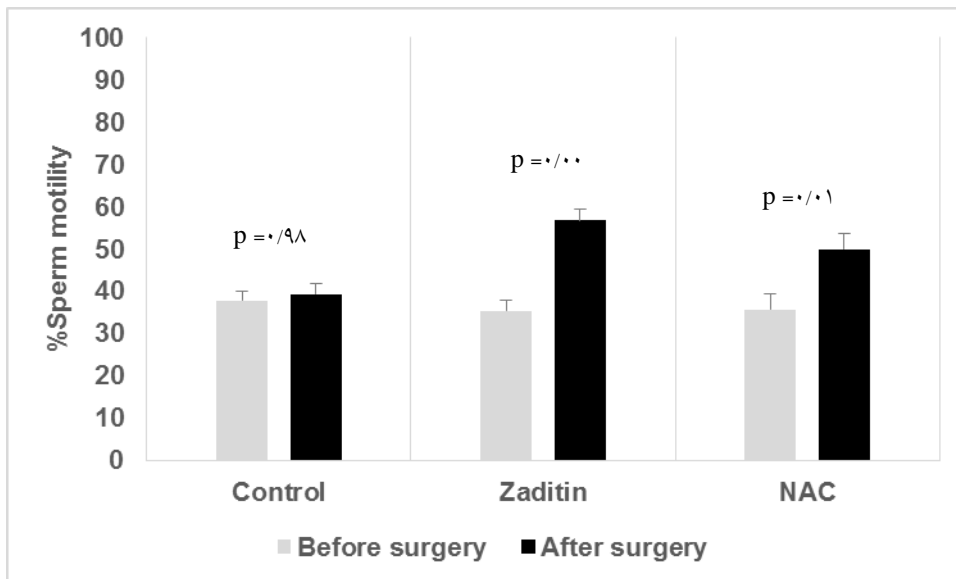
شکل ۱- رنگ‌آمیزی CMA^+ : اسپرم‌های با رنگ زرد درخشان به عنوان CMA^+ (دارای کمبود پروتامین) در نظر گرفته می‌شوند.

جدول ۱- مقایسه پارامترهای اسپرمی قبل از واریکوسلکتومی در گروه کنترل، زادیتن و NAC. (فاقد اختلاف معنی‌دار).

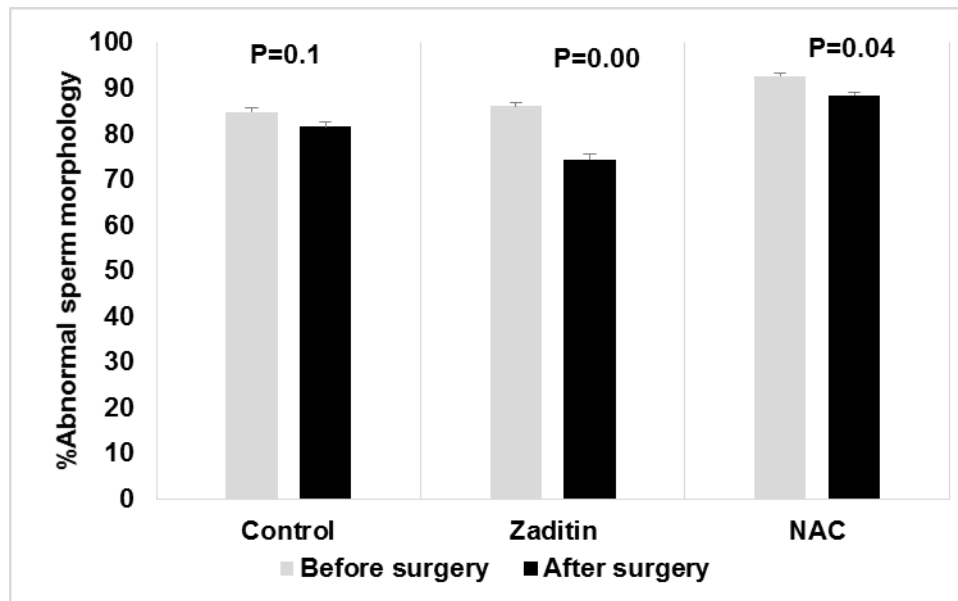
پارامترها	کنترل (n = ۴۶)	زادیتن (n = ۴۷)	NAC (n = ۳۵)
سن مردان	$28/61 \pm 4/71$	$31/02 \pm 5/72$	$30/1 \pm 4/35$
غلظت اسپرم (میلیون در هر میلی‌لیتر)	$19/93 \pm 2/83$	$31/87 \pm 2/63$	$29/05 \pm 4/41$
تحرک اسپرم (%)	$37/79 \pm 2/23$	$35/47 \pm 2/34$	$35/78 \pm 3/52$
مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم (%)	$84/75 \pm 0/88$	$86/10 \pm 0/82$	$88/48 \pm 0/65$
کمبود پروتامین اسپرم (%)	$50/22 \pm 1/07$	$53/89 \pm 1/50$	$51/28 \pm 2/41$



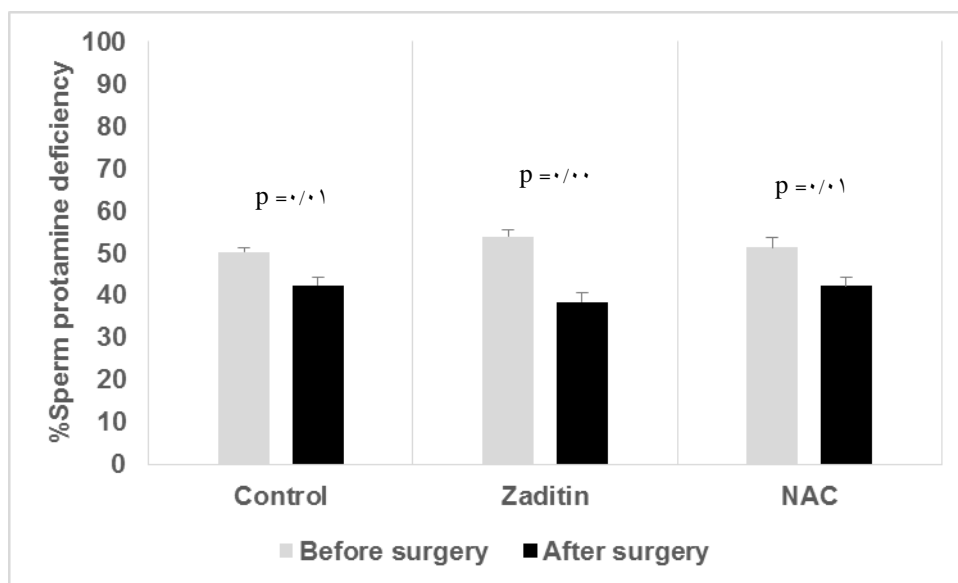
نمودار ۱- مقایسه غلظت اسپرم قبل و بعد از عمل واریکوسلکتومی در گروه کنترل، زادیتن و NAC. P-value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری، معنی دار در نظر گرفته شده است.



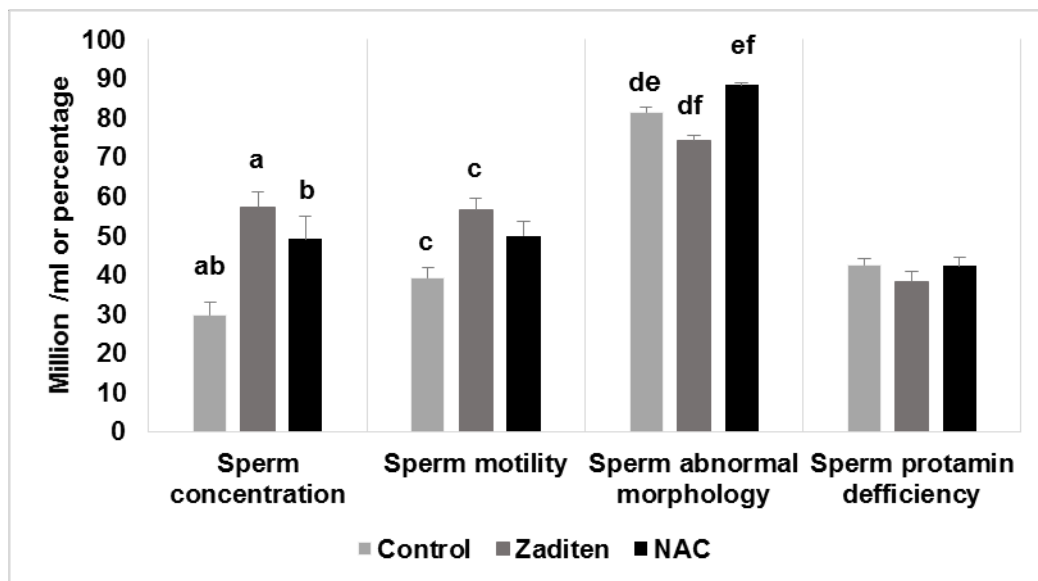
نمودار ۲- مقایسه درصد تحرک اسپرم قبل و بعد از عمل واریکوسلکتومی در گروه کنترل، زادیتن و NAC. P-value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری، معنی دار در نظر گرفته شده است.



نمودار ۳- مقایسه درصد اسپرم های دارای مورفولوژی غیر طبیعی قبل و بعد از عمل واریکوسلکتومی در گروه کنترل، زادیتن و NAC. P-value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری، معنی دار در نظر گرفته شده است.



نمودار ۴- مقایسه درصد اسپرم های دارای کمبود پروتامین، قبل و بعد از عمل واریکوسلکتومی در گروه کنترل، زادیتن و NAC. P-value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری، معنی دار در نظر گرفته شده است.



نمودار ۵- مقایسه پارامترهای اسپرمی و کمبود پروتامین بعد از عمل واریکوسلکتومی در گروه کنترل، زادیتن و NAC. حروف مشترک نشان‌دهنده معنی‌داری بین سه گروه، برای پارامتر مورد نظر می‌باشد.

بحث

میکروسرجیکال ۴۲ درصد و میزان کلی عود ۱/۰۵ درصد است (۱۶). امروزه درمان دارویی برای طیف گسترده‌ای از زوج‌های نابارور تجویز می‌شود و احتمال می‌رود که استفاده همزمان از عمل جراحی و دارو برای افراد مبتلا به واریکوسل، باعث بهبود بیشتر پارامترهای اسپرمی شده که می‌تواند شانس باروری به روش طبیعی را افزایش دهد (۴، ۶، ۱۳). در این مطالعه نتایج استفاده از NAC، به عنوان آنتی-اکسیدان و زادیتن به عنوان ماست سل بلاکر، بر روی پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) و محتوای پروتامین اسپرم، بعد از عمل جراحی واریکوسلکتومی مورد بررسی قرار گرفته است. آنتی-اکسیدان NAC، در موجودات زنده به صورت طبیعی از اسید آمینه L-سیستئین تولید شده و بعنوان پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد و ضدآپوپتوز است و مستقیماً پراکسید هیدروژن، اسیدهیپوکلیک و هیدروکسیل را پاک‌سازی می‌کند.

واریکوسل در ۴۰ درصد مردان با ناباروری اولیه و ۸۰ درصد مردان با ناباروری ثانویه قابل مشاهده است. در بیماری واریکوسل برگشت و توقف خون گرم بداخل رگ‌های اسپرماتید داخلی باعث افزایش حدود ۲/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در دمای اسکروتوم شده و با اختلال در روند اسپرماتوژنز، بر عملکرد بیضه و بلوغ اسپرم در اپیدیدیم اثر گذاشته و سبب کاهش کیفیت پارامترهای اسپرمی (غلظت، تحرک و مورفولوژی) می‌گردد (۱، ۱۵، ۲۳، ۳۱). با توجه به دستورالعمل انجمن اورولوژی اروپا (EAU) ۲۰۱۴، درمان واریکوسل باید در موارد واریکوسل بالینی، الیگوزواسپرمی، استمرار ناباروری بیش از دو سال و ناباروری به دلایل ناشناخته انجام شود. در حال حاضر با استفاده از روش‌های متآنالیز، از بین روش‌های جراحی مختلف، روش واریکوسلکتومی میکروسرجیکال، بعنوان تکنیکی با میزان بالای موفقیت و عوارض پایین پیشنهاد می‌شود، بطوری که میزان بارداری خود به خودی بعد از واریکوسلکتومی

است (نمودار ۱). همچنین افزایش غلظت اسپرم در گروه‌هایی که دارو استفاده کرده‌اند نسبت به گروه کنترل که فقط عمل جراحی انجام داده است، به طور معنی‌داری بهتر است (نمودار ۵). در افراد مبتلا به واریکوسل، افزایش آپوپتوز منجر به کاهش جمعیت رده‌های مختلف سلول‌های زایا، مانند اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید و همچنین اسپرم شده و منجر به کاهش غلظت اسپرم در افراد مبتلا به واریکوسل نسبت به افراد بارور می‌گردد (۲۷، ۱)، که این اثرات به دنبال عمل واریکوسلکتومی و مصرف این داروها بهبود می‌یابد. به علاوه، واسطه‌های مترشحه از ماست‌سل‌ها، باعث القاء التهاب و اختلال در سد خونی-بیضه‌ای شده و ممکن است با اختلال در عملکرد سلول‌های لایه زاینده، منجر به کاهش تعداد اسپرم گردد (۲۷، ۱۹).

احتمالاً با تاثیر زادیتن بر روی غشای ماست سل‌ها و جلوگیری از آزاد شدن واسطه‌های مترشحه از آنها، التهاب، تغییرات فیبروتیک و اختلالات اسپرماتوزنیک، کاهش یافته و تعداد اسپرم پس از عمل و مصرف دارو بهبود یافته است. همچنین، مصرف NAC احتمالاً با پاکسازی کردن رادیکال‌های آزاد و خنثی کردن اثرات سمی آنها، باعث افزایش تعداد اسپرم می‌گردد (۱۰)، بعلاوه براساس نتایج مطالعات قبلی، NAC سرکوب کننده آپوپتوز در سلول‌های زاینده انسانی در *in vitro* بوده و به این دلیل یک گزینه درمانی مناسب برای افراد الیگوزواسپرمی می‌باشد و احتمالاً از این طریق به افزایش غلظت اسپرم بعد از عمل کمک می‌کند (۱۲).

بر اساس نتایج این مطالعه، تحرک اسپرم در گروهی که بعد از عمل، داروی زادیتن و NAC را استفاده نموده‌اند، به طور معنی‌داری نسبت به قبل از عمل افزایش یافته است (نمودار ۲). با افزایش دمای بیضه در مردان مبتلا به واریکوسل، فرآیند اسپرماتوزن

N-استیل‌سیستئین پیش‌ساز گلو‌تاتیون است که بعنوان یک آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی عمل می‌کند (۱۲، ۱۷). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با مصرف داروی NAC در افراد نابارور مبتلا به واریکوسل بعد از عمل جراحی، پارامترهای اسپرمی و سلامت کروماتین اسپرم به طور معنی‌داری افزایش و سطح استرس اکسیداتیو به طور معنی‌داری نسبت به قبل از عمل، کاهش می‌یابد (۶).

یکی دیگر از داروهای استفاده شده در افراد نابارور، داروهای ماست‌سل‌بلاکرها می‌باشد که استفاده از این داروها بر پایه افزایش تعداد ماست سل‌ها در بیضه، اپیدیدیم و مایع فولیکولی افراد نابارور الیگوزواسپرمی، آزنواسپرمی، آستنوزواسپرمی و افراد مبتلا به واریکوسل است. افزایش تعداد ماست سل‌ها و ترشح مواد شیمیایی مانند هیستامین، هیپارین، تریپتاز، کیماز، پروستاگلاندین و غیره از آنها باعث ایجاد فیبروز در اطراف لوله‌های منی‌ساز شده و در نهایت باعث اختلال در اسپرماتوزن می‌گردد (۳، ۱۱، ۱۴، ۲۸، ۳۴). بر طبق نتایج بدست آمده از مطالعات مختلف استفاده از این داروها دارای اثرات پایدارکنندگی بر روی غشای ماست‌سل‌ها بوده و مانع رها شدن هیستامین و بقیه واسطه‌های شیمیایی از ماست‌سل‌ها شده و کیفیت پارامترهای اسپرمی را بهبود می‌بخشد (۴، ۲۹).

با توجه به افزایش معنی دار ماست‌سل‌ها در افراد آستنوزواسپرمی با علت ناشناخته و آستنوزواسپرمی مرتبط با واریکوسل در مقایسه با گروه کنترل (۲۷)، در مطالعه قبلی این آنتی‌اکسیدان در افراد مبتلا به واریکوسل مورد بررسی قرار گرفت که موجب بهبودی در پارامترهای اسپرمی و سلامت کروماتین اسپرم گردید (۴).

در این مطالعه غلظت اسپرم در گروهی که بعد از عمل، داروی زادیتن و NAC را استفاده نموده‌اند، به طور معنی‌داری نسبت به قبل از عمل افزایش یافته

در منطقه آکروزمی و بخش میانی اسپرم وجود دارد و از طریق مسیر پروتئین کیناز فعال کننده میتوژن، حرکت اسپرم انسان را کاهش می دهد که این اثرات با استفاده از دارو و کاهش آزاد شدن واسطه های التهابی کنترل می گردد. همچنین ROS، تحریک کننده دگرانوله شدن ماست سل ها و آزادسازی تریپتاز و هیستامین می باشد، که کنترل سطح استرس اکسیداتیو، باعث کاهش آزادسازی این واسطه های التهابی می گردد (۳۳).

بر اساس نتایج این مطالعه میزان اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی در گروهی که بعد از عمل داروی زادیتن و NAC را استفاده نموده اند، به طور معنی داری نسبت به قبل از عمل کاهش یافته است. همچنین میزان اسپرم با مورفولوژی غیرطبیعی در گروهی که زادیتن، استفاده کرده اند نسبت به گروه کنترل که فقط عمل جراحی انجام داده اند، به طور معنی داری کمتر است (نمودار ۵). بعلاوه درصد مورفولوژی غیرطبیعی اسپرم در گروه زادیتن بطور معنی داری کمتر از گروه NAC می باشد. واریکوسل با ایجاد یک الگوی استرسی، سبب تخلیه ی ذخایر اکتین از سیتواسکلت اسپرم و ایجاد ناهنجاری های مورفولوژیکی در سر اسپرم می شود. همچنین، واریکوسل می تواند با تأثیر بر سلول های سرتولی باعث واکنش شدن و آزاد شدن اسپرم ها قبل از بلوغ کامل شده، که از این طریق باعث حضور اسپرم های نابالغ و دارای مورفولوژی غیرطبیعی در انزال می گردد (۱۷).

داروی زادیتن احتمالاً با کاهش بافت فیروز توبولار و افزایش خون رسانی به اپیتلیوم لایه زاینده، باعث بهبود درصد مورفولوژی اسپرم و در نهایت، تأثیر آن در روند لقاح و باروری می شود (۴، ۲۶). طی اسپرمیوژن ۸۵٪ هیستون ها با پروتامین جایگزین می شوند. نتیجه این امر تراکم بیشتر کروماتین اسپرم و حفاظت آن در برابر نوکلئازها می باشد. عدم جایگزینی پروتامین با هیستون، اسپرم را بیشتر مستعد آسیب DNA و فعال

تحت تأثیر قرار گرفته و سطح ROS افزایش می یابد. با افزایش سطح ROS نسبت به میزان آنتی اکسیدان های مایع منی، فعالیت سایر آنتی اکسیدان های طبیعی آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز نیز ممکن است، مختل شود که با تأثیر بر تولید انرژی در دسترس اسپرم، تحرک اسپرم را کاهش می دهد. همچنین در این افراد، افزایش سطح رادیکال های آزاد، باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در ساختار غشای سر اسپرم و قطعه میانی شده و با تغییر در سیالیت غشا، باعث کاهش میزان تحرک اسپرم می شود (۱، ۸). بر اساس نتایج بدست آمده، آنتی-اکسیدان درمانی و تجویز گلوکوتایون به بیماران مبتلا به واریکوسل که ROS مایع منی آنها بالا است سبب بهبود درصد تحرک اسپرم ها می شود (۲۰). بعلاوه، NAC دارای قابلیت کاهش پیوندهای دی سولفید برای کاهش ویسکوزیته بافت مخاطی می باشد و استفاده از این دارو در افراد نابارور با دلایل ناشناخته، علاوه بر کاهش سطح استرس اکسیداتیو باعث کاهش ویسکوزیته اسپرم شده است که برای لقاح مهم می باشد، چرا که افزایش ویسکوزیته باعث می شود که اسپرم ها در یک توده موکوسی و فیروزی گیر افتاده و از مهاجرت آنها در دستگاه تناسلی زن تا رسیدن به محل لقاح جلوگیری کند (۹).

افزایش تحرک اسپرم در گروهی که زادیتن، استفاده کرده اند نسبت به گروه کنترل که فقط عمل جراحی انجام داده اند، به طور معنی داری بهتر است (نمودار ۵).

مطالعات قبلی نشان می دهد که استفاده از زادیتن بر روی مردان نابارور اولیگوزواسپرمی و آستنوزواسپرمی با علت ناشناخته و لکوسیتواسپرمیا، منجر به بهبود معنی داری در تحرک اسپرم می گردد (۲۶، ۳۰). احتمالاً دلیل این افزایش تحرک این است که تریپتاز تولید شده از ماست سل ها از طریق رسپتور PAR2 که



بهبود در پارامترهای اسپرمی و محتوای پروتامین با مصرف داروی زادیتن بالاتر از استفاده از داروی NAC می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از پرسنل محترم پژوهشکده زیست فناوری و مسئولان گرامی پژوهشگاه رویان ابراز می‌دارند.

منابع

1. Agarwal A., Hamada A., Esteves S.C., 2012. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. *Nature Reviews Urology*, 9(12): 678-690.
2. Akiyama M., 1999. In vivo scavenging effect of ethylcysteine on reactive oxygen species in human semen. *Nihon Hinyokika Gakkai zasshi. The Japanese journal of urology*, 90(3): 421-428.
3. Allam J.P., Langer M., Fathy A., Oltermann I., Bieber T., Novak N., Haidl G., 2009. Mast cells in the seminal plasma of infertile men as detected by flow cytometry. *Andrologia*, 41(1): 1-6.
4. Azadi L., Abbasi H., Deemeh M.R., Tavalae M., Arbabian M., Pilevarian A.A., Nasr-Esfahani M.H., 2011. Zaditen (Ketotifen), as mast cell blocker, improves sperm quality, chromatin integrity and pregnancy rate after varicolectomy. *International journal of andrology*, 34(5pt1): 446-452.
5. Bahreinian M., Tavalae M., Abbasi H., Kiani-Esfahani A., Shiravi A.H., Nasr-Esfahani, M.H., 2015. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. *Systems of Biology in Reproductive Medicine*, 61(4): 179-186.
6. Barekat F., Tavalae M., Deemeh M.R., Bahreinian, M., Azadi, L., Abbasi, H., Nasr-Esfahani, M.H., 2016. A Preliminary Study: N-acetyl-L-cysteine Improves Semen Quality following Varicolectomy.

شدن مسیرهای آپوپتوزی می‌کند و در نتیجه بر میزان لقاح و باروری اثرگذار است. مطالعات نشان می‌دهند که در مردان نابارور مبتلا به واریکوسل، نقص در جایگزینی هیستون به جای پروتامین منجر به ایجاد کروماتین نسبتاً دکاندنس شده که با افزایش حساسیت نسبت به ROS، منجر به آسیب DNA اسپرم می‌شود (۸، ۲۵). همچنین ROS غشاهای درونی و بیرونی میتوکندری اسپرم را تخریب می‌کند که با پروتئین سیتوکروم C و فعالیت کاسپازها و آپوپتوز در ارتباط می‌باشند و در نهایت استرس اکسیداتیو می‌تواند باعث اکسیداسیون جفت بازها و فراگمتاسیون DNA شود (۱، ۱۶). در این مطالعه بعد از عمل جراحی به تنهایی و عمل جراحی با مصرف داروی NAC و زادیتن میزان اسپرم‌های داری کمبود پروتامین به طور معنی-داری کاهش می‌یابد. مطالعات نشان داده است که آنتی‌اکسیدان‌ها، محافظت‌کننده و پاکسازی‌کننده اسپرم از ROS تولید شده می‌باشد که می‌تواند از فراگمتاسیون DNA جلوگیری کرده و کیفیت اسپرم را بهبود دهد.

این بدان معنا است، درصد بهبود محتوای طبیعی پروتامین پس از عمل و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها احتمالاً می‌تواند باعث کاهش آسیب DNA می‌شود (۶، ۱۳). بعلاوه در مطالعه دیگری، کاهش قابل توجهی از سطح ROS را بعد از استفاده از NAC گزارش کردند (۲).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که هر دو داروی زادیتن و NAC باعث بهبود پارامترهای اسپرمی و محتوای پروتامین اسپرم می‌شود و عملکرد اسپرم را از طریق کاهش التهاب و فیروز در اطراف لوله‌های سمینی‌فروس، کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن و افزایش تولید گلوکوتایون بهبود می‌بخشد. اما میزان



15. Hauser R., Paz G., Botchan A., Yogev L., Yavetz H., 2001. Varicocele and male infertility: Part II: Varicocele: effect on sperm functions. *Human Reproduction Update*, 7(5): 482-485.
16. Kim K.H., Lee J.Y., Kang D.H., Lee H., Seo J.T., Cho K.S., 2013. Impact of surgical varicocele repair on pregnancy rate in subfertile men with clinical varicocele and impaired semen quality: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Korean Journal of Urology*, 54(10): 703-709.
17. Lappas M., Permezel M., Rice G.E., 2003. N-acetyl-cysteine inhibits phospholipid metabolism, proinflammatory cytokine release, protease activity, and Nuclear Factor- κ B deoxyribonucleic acid-binding activity in human fetal membranes in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(4): 1723-1729.
18. Lopes S., Jurisicova A., Sun J.G., Casper R.F., 1998. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 13(4): 896-900.
19. Meineke V., Frungieri M.B., Jessberger B., Vogt H.J., Mayerhofer A., 2000. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. *Fertility and Sterility*, 74(2): 239-244.
20. Michael A.J., Alexopoulos C., Pontiki, E.A., Hadjipavlou-Litina D.J., Saratsis P., Ververidis H.N., Boscov, C. M., 2010. Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(2): 201-207.
21. Mostafa R.M., Abol-Magd R., Younis S.E., Dessouki O.F., Azab M., Mostafa T., 2017. Assessment of seminal mast cells in infertile men with varicocele after surgical repair. *Andrologia*, 49(3).
7. Belay R.E., Huang G.O., Shen J.K.C., Ko E.Y.K., 2016. Diagnosis of clinical and subclinical varicocele: how has it evolved? *Asian Journal of Andrology*, 18(2): 182-185.
8. Belhadj Slimen I., Najjar T., Ghram A., Dabbebi H., Ben Mrad M., Abdrabbah M., 2014. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International Journal of Hyperthermia*, 30(7): 513-523.
9. Ciftci H., Verit A., Savas M., Yeni E., Erel O., 2009. Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. *Urology*, 74(1): 73-76.
10. Comhaire F.H., Christophe A.B., Zalata A.A., Dhooge W.S., Mahmoud A.M.A., Depuydt C.E., 2000. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 63(3): 159-165.
11. El-Karakasy A., Mostafa T., Shaeer O. K., Bahgat D. R., Samir N., 2007. Seminal mast cells in infertile asthenozoospermic males. *Andrologia*, 39(6): 244-247.
12. Erkkila K., Hirvonen V., Wuokko E., Parvinen M., Dunkel L., 1998. N-acetyl-L-cysteine inhibits apoptosis in human male germ cells in vitro. *The Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 83(7): 2523-2531.
13. Garg H., Kumar R., 2016. An update on the role of medical treatment including antioxidant therapy in varicocele. *Asian journal of andrology*, 18(2): 222-228.
14. Haidl G., Duan Y.G., Chen S.J., Kohn F.M., Schuppe H.C., Allam J.P., 2011. The role of mast cells in male infertility. *Expert Review of Clinical Immunology*, 7(5): 627-634.



- infertile men. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 6(1): 19.
30. Schlil W.B., Schneider J., Ring J., 1986. The use of ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligo-and asthenozoospermia. *Andrologia*, 18(6): 570-573.
31. Tavalae M., Abbasi H., Deemeh M. R., Fotohi F., Gilani M.A.S., Nasr Esfahani M.H., 2012. Semen parameters and chromatin packaging in microsurgical varicocele patients. *International Journal of Fertility and Sterility*, 6(3): 165-174.
32. Tavalae M., Bahreinian M., Barekat F., Abbasi H., Nasr-Esfahani M.H., 2015. Effect of varicocele on sperm functional characteristics and DNA methylation. *Andrologia*, 47(8): 904-909.
33. Weidinger S., Mayerhofer A., Kunz L., Albrecht M., Sbornik M., Wunn E., Kohn F.M., 2005. Tryptase inhibits motility of human spermatozoa mainly by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Human Reproduction*, 20(2): 456-461.
34. Welter H., Köhn F.M., Mayerhofer A., 2011. Mast cells in human testicular biopsies from patients with mixed atrophy: increased numbers, heterogeneity, and expression of cyclooxygenase 2 and prostaglandin D2 synthase. *Fertility and Sterility*, 96(2): 309-313
35. World Health Organization (WHO), 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Cambridge: Cambridge University Press. 1-271.
22. Nasr-Esfahani M.H., Razavi S., Mardani M., 2001. Andrology: Relation between different human sperm nuclear maturity tests and in vitro fertilization. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18(4): 221-227.
23. Nasr-Esfahani M.H., Abbasi H., Razavi S., Ashrafi S., Tavalae M., 2009. Varicocele: semen parameters and protamine deficiency. *International Journal of Andrology*, 32(2): 115-122.
24. Nasr-Esfahani M.H., Tavalae M., 2012. Origin and role of DNA damage in varicocele. *International Journal of Fertility and Sterility*, 6(3): 141-146.
25. Navaeian-Kalat E., Deemeh M.R., Tavalae M., Abbasi H., Modaresi M., Nasr-Esfahani M.H., 2012. High total acrosin activity in varicocele individuals. *Andrologia*, 44(s1): 634-641.
26. Oliva A., Multigner L. (2006). Ketotifen improves sperm motility and sperm morphology in male patients with leukocytospermia and unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 85(1): 240-243.
27. Pasqualotto F.F., Lucon A.M., de Góes P.M., Hallak J., Sobreiro B., Pasqualotto E.B., Arap S., 2005. Testicular growth, sperm concentration, percent motility, and pregnancy outcome after varicocele based on testicular histology. *Fertility and sterility*, 83(2): 362-366.
28. Roaiah M.M.F., Khatab H., Mostafa T., 2007. Mast cells in testicular biopsies of azoospermic men. *Andrologia*, 39(5): 185-189.
29. Saharkhiz N., Nikbakht R., Hemadi M., 2013. Ketotifen, a mast cell blocker improves sperm motility in asthenospermic

